家蚕蛹期雌雄生殖腺蛋白质双向电泳比较分析

毛立明，林健荣*，赵 峰，钟杨生，王叶元，孔庆明，徐秋云

（华南农业大学动物科学学院蚕丝科学系，广州 510642）

摘要：分析家蚕 *Bombyx mori* 雌雄生殖腺细胞蛋白质，有利于发现性别分化相关的功能蛋白质，探讨生殖腺发育相关基因的表达调控机理。本研究利用蛋白质双向凝胶电泳和图像分析技术，分析家蚕蛹期第 2 天的雌雄生殖腺细胞蛋白质。结果表明：在雄蚕生殖腺蛋白质电泳图谱中共检测到 435 个蛋白斑点，其中特异性蛋白斑点 73 个，占总蛋白斑点数的 16.8%；雌蚕生殖腺的电泳图谱中有 417 个蛋白斑点，其中特异性蛋白斑点 55 个，占总蛋白斑点数的 13.2%。雌雄能匹配的蛋白斑点有 362 对，匹配率达 85.0%。

关键词：家蚕；生殖腺；蛋白质；双向电泳；图谱分析

中图分类号：S882.6 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2007)06-0628-06

Comparison of proteins from the pupal gonads of silkworms (*Bombyx mori*) of both sexes by two dimensional electrophoresis

MAO Li-Ming，LIN Jian-Rong*，ZHAO Feng，ZHONG Yang-Sheng，WANG Ye-Yuan，KONG Qing-Ming，XU Qiu-Yun (Department of Silkworm Science，College of Animal Science，South China Agricultural University，Guangzhou 510642，China)

Abstract：The comparison of protein patterns between male and female gonads will not only contribute to the finding of functional proteins related to sexual traits，but also help exploring the regulating mechanism of related genes during the development of gonad. In this study，using two dimensional electrophoresis (2-DE) and gel image analysis system，we compared the proteins in the male and female gonads of silkworm at the 2nd day of the pupal stage. A total of 435 protein spots were detected in the 2-DE pattern of male gonad，of which 73 were the specific protein spots，occupying 16.8% of the total. There were 417 protein spots in the 2-DE pattern of female gonad，of which 55 were specific ones，occupying 13.2% of the total. Comparison showed that 362 pairs were matched in the 2-DE patterns of both male and female，with the match percentage as high as 85.0%.

Key words：*Bombyx mori*；gonad；protein；2DE；image analysis

蚕业生产中，雄蚕在抗病性、叶丝转化率等经济性状上均优于雌蚕，这引起人们对雌雄性别关联基因的兴趣。用蛋白质组学方法，对家蚕 *Bombyx mori* 不同发育阶段不同组织器官的蛋白质进行分析，筛查与性别分化相关联的蛋白质，进而确定其功能，这有助于探索家蚕性别基因的表达调控机理。

家蚕繁殖后代依赖于其生殖系统，雌蚕的卵巢和雄蚕的睾丸是生殖细胞分化发育的结果。本实验从雌雄蚕生殖腺的细胞蛋白入手，通过双向电泳技术，从生殖细胞的蛋白组分、类型，分子量、等电点等进行比较分析，探讨其与性别分化的功能关系，为解释生殖发育过程中的基因表达调控提供新见解。

1 材料与方法

1.1 材料

供试家蚕品种：57 限，由华南农业大学蚕丝科学系提供，常规饲养。

1.2 生殖腺的处理与蛋白样品的制备

解剖取出家蚕蛹期第 2 天的雌性卵巢和雄性睾

基金项目：广东省科技计划项目(2005B40101012)；广东省农业科技计划项目[粤财农(2004)295 号]

作者简介：毛立明，男，1981 年生，山东人，博士研究生，主要从事家蚕分子生物学研究，E-mail：lmmao01@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：jrlin@scau.edu.cn

收稿日期 Received：2006-12-05；接受日期 Accepted：2007-05-13

丸，分别用适量 ddH_2O 漂洗后放于离心管内，冻干后保存于 -80℃备用。蛋白的提取参照 Lametsch 等(2003)、钟伯雄等(2003)以及 Hwang 等(2004)方法，并略作改进。按 Bradford 法(詹显全等，2002) 测定蛋白质含量。样品保存于 -80℃备用。

1.3　蛋白质双向电泳分析

第 1 向等电聚焦电泳(IEF)使用 IPGphor 等电聚焦仪，参照仪器使用说明书进行操作，使用 18 cm，pH 3 ~ 10 的 IPG 干胶条，500 μg 上样量；第 2 向 SDS-PAGE 用 12.5%的分离胶。电泳后凝胶银染显色参考谢锦云等(2003)方法。

1.4　双向电泳图谱分析

利用 Amersham Pharmacia 公司的 Image Master™ 2D Platinum 5.0 软件对双向电泳所得图谱进行分析，按说明书操作。

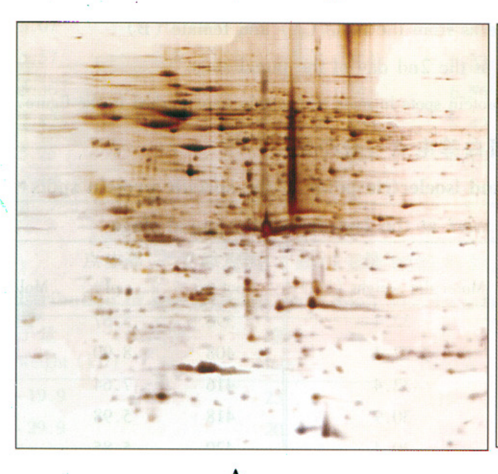
2　结果与分析

家蚕蛹期第 2 天的雌雄生殖腺蛋白样品经双向电泳分析和银染法显色，结果见图 1。由图 1 可见雄蚕生殖腺蛋白样品中共检测到 435 个蛋白斑点，其中特异性蛋白斑点 73 个，占总蛋白斑点数的 16.8%。雌蚕生殖腺蛋白样品中共检测到 417 个蛋白斑点，其中特异性蛋白斑点 55 个，占总蛋白斑点数的 13.2%。雌雄能匹配的蛋白斑点有 362 对，匹配率达到 85.0%。雌雄蚕中特异性的蛋白斑点标于图 2 中，各特异性蛋白斑点的等电点与分子量列于表 1 和表 2。对表 1 和表 2 中雌雄等电点和分子量进行统计分析整理，结果列于表 3。

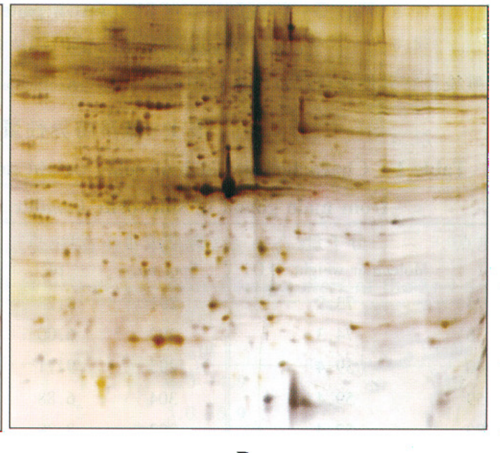
雌雄家蚕蛹的特异蛋白斑点，从分子量值的大小看，主要分布在 10 kD ~ 40 kD 之间。雄蚕占了特异蛋白斑点总数的 79.5%，雌蚕占了特异蛋白斑点总数的 76.4%。雄蚕特异蛋白斑点在等电点方向分布相对均匀，等电点在 4 ~ 7 间偏酸性区内的点只有 52.1%，而雌蚕特异蛋白斑点多为酸性蛋白，等电点在 4 ~ 7 之间的点达到 78.2%。

为了进一步比较雌雄蚕共有蛋白斑点的量值上差异，更好地分析估测同类蛋白质性别间的差异情况，对 Image Master™ 2D Platinum 5.0 软件生成的匹配报告进行统计分析，将雌雄蚕之间都存在，且含量相差 3 倍以上的点的量值信息列于表 4 和表 5。

从表 4 可以看到，雌蚕生殖腺蛋白双向电泳图谱中含量大于雄蚕 3 ~ 4 倍的蛋白斑点有 12 个，4 ~ 5 倍的有 9 个，5 ~ 6 倍的有 6 个，6 ~ 7 倍的有 4 个，7 ~ 8 倍的有 4 个，8 倍以上的有 7 个。表 5 的结果显示，雄蚕中含量大于雌蚕 3 ~ 4 倍的蛋白斑点有 19 个，4 ~ 5 倍的有 9 个，5 ~ 6 倍的有 6 个，大于 6 倍的有 6 个。雌蚕蛋白含量大于雄蚕 3 倍的点总共 42 个，雄蚕蛋白含量大于雌蚕 3 倍的为 40 个，数量相当。含量倍数大于 5 倍的点雌蚕高于雄蚕，分别为 21 个和 12 个，雌蚕有更多高丰度蛋白的表达。



A



B

图 1　雄蚕(A)和雌蚕(B)蛹期第 2 天生殖腺蛋白双向电泳图谱

Fig. 1　2DE-PAGE pattern of proteins extracted from the male (A) and female (B) gonads of silkworm *Bombyx mori* at the 2nd day of the pupal stage

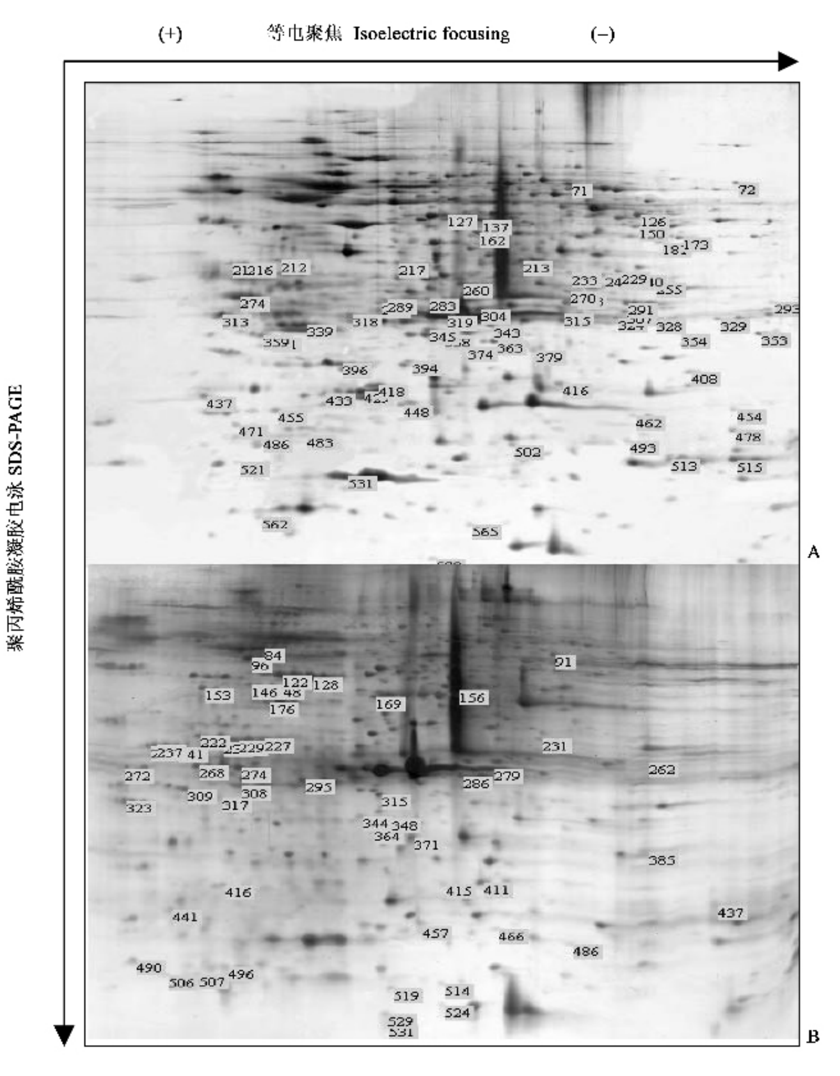


图 2 雄蚕(A)和雌蚕(B)生殖腺双向电泳图谱比较

Fig. 2 Comparison of 2DE-PAGE patterns from the male (A) and female (B) gonads of silkworm *Bombyx mori* at the 2nd day of the pupal stage

雌雄蚕特异性蛋白斑点已在图中标注。 The specific protein spots in male and female were marked in the figure.

表 1 雄蚕特异性蛋白等电点与分子量

Table 1 Characteristics of molecular weight and isoelectric point of the specific protein spots from male gonad of silkworm *Bombyx mori* at the 2nd day of the pupal stage

斑点编号 Spot no.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)	斑点编号 Spot no.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)	斑点编号 Spot no.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)
71	7.73	73.9	291	8.28	32.4	396	5.67	21.2
72	9.36	74.3	292	6.00	32.4	408	8.90	20.0
126	8.40	59.4	293	9.71	32.4	416	7.64	19.0
127	6.59	59.4	304	6.88	30.9	418	5.98	19.0
137	6.89	57.4	307	8.28	30.4	429	5.85	18.8
150	8.39	54.9	313	4.61	29.7	433	5.52	18.8
162	6.87	52.5	315	7.66	30.0	437	4.47	18.7
173	8.81	50.7	318	5.75	29.6	448	6.20	18.5
181	8.61	49.2	319	6.59	29.4	454	9.33	18.4
212	5.12	43.4	324	8.19	29.1	455	5.10	18.4
213	7.27	43.2	328	8.55	28.8	462	8.35	18.3
216	4.83	42.6	329	9.18	28.9	471	4.75	18.1
217	6.17	42.7	339	5.35	27.8	478	9.33	17.9

续表 1 Table 1 continued

斑点编号 Spot no.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)	斑点编号 Spot no.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)	斑点编号 Spot no.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)
218	4.70	42.6	343	7.00	27.6	483	5.35	17.8
229	8.21	40.2	345	6.44	26.7	486	4.96	17.8
233	7.73	39.7	353	9.58	26.1	493	8.30	17.7
240	8.37	39.3	354	8.80	26.1	502	7.18	17.6
242	8.06	39.1	358	6.56	25.7	513	8.70	17.3
255	8.55	37.3	359	4.97	25.7	515	9.34	17.3
260	6.72	36.8	361	5.04	25.5	521	4.76	17.2
270	7.71	35.1	363	7.02	24.8	531	5.71	16.9
273	7.78	34.3	374	6.76	23.7	562	4.95	16.0
274	4.76	33.7	379	7.39	23.2	565	6.80	15.9
283	6.43	33.2	394	6.27	21.5	579	6.48	15.2
289	6.06	32.9						

表 2　雌蚕特异性蛋白等电点与分子量

Table 2　Characteristics of molecular weight and isoelectric point of the specific protein spots from female gonad of silkworm *Bombyx mori* at the 2nd day of pupal stage

斑点编号 Spot no.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)	斑点编号 Spot no.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)	斑点编号 Spot no.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)
84	5.57	65.2	240	4.67	34.7	385	8.78	18.8
91	7.95	62.8	241	4.89	34.4	411	7.30	18.1
96	5.46	61.2	262	8.78	31.1	415	6.98	18.1
111	10.1	58.4	268	5.05	30.5	416	5.26	18.1
122	5.7	54.9	272	4.47	29.8	437	9.40	17.6
128	5.94	54.1	274	5.38	30.1	441	4.85	17.5
146	5.46	51.6	279	7.39	29.8	457	6.80	17.2
148	5.64	51.4	286	7.12	28.5	466	7.43	17.1
149	5.55	51.5	295	5.88	27.8	486	8.10	16.8
153	5.10	50.5	308	5.38	26.7	490	4.56	16.5
156	7.09	49.8	309	4.96	26.2	496	5.28	16.3
169	6.43	47.7	315	6.48	25.2	506	4.81	16.2
176	5.60	46.2	317	5.23	24.8	507	5.05	16.2
222	5.07	37.0	323	4.48	24.2	514	6.97	16.0
227	5.57	36.2	344	6.33	21.9	519	6.57	15.9
229	5.36	35.9	348	6.56	21.6	524	6.97	15.6
231	7.82	36.2	364	6.42	20.3	529	6.53	15.4
233	5.25	35.5	371	6.73	19.2	531	6.53	15.2
237	4.72	34.9						

表 3　雌雄蚕生殖腺特异蛋白斑点分子量和等电点分布

Table 3　Distribution of special spots from male and female gonads of silkworm *Bombyx mori* at the 2nd day of pupal stage

分子量 Molecular weight (kD)	雄 Male	雌 Female	等电点 pI	雄 Male	雌 Female
10 – 19.9	23	19	4.0 – 4.9	10	9
20 – 29.9	20	12	5.0 – 5.9	11	21
30 – 39.9	15	11	6.0 – 6.9	17	13
40 – 49.9	7	3	7.0 – 7.9	11	7
50 – 59.9	6	7	8.0 – 8.9	17	3
60 – 69.9	0	3	≥9.0	7	2
70 – 80	2	0			

表 4 雌蚕生殖腺 2DE 图谱中蛋白含量大于雄蚕 3 倍的点

Table 4 The spots whose abundance in female is over 3-fold to that in male

匹配组号 Matched group ID	雄含量 Abundance in male	雌含量 Abundance in female	倍数 Fold	匹配组号 Matched group ID	雄含量 Abundance in male	雌含量 Abundance in female	倍数 Fold	匹配组号 Matched group ID	雄含量 Abundance in male	雌含量 Abundance in female	倍数 Fold
350	46.00	140.2	3.05	523	53.26	229.1	4.30	284	104.9	662.8	6.32
446	112.7	345.2	3.06	535	128.4	560.7	4.37	571	11.10	74.16	6.68
496	95.30	295.9	3.10	469	76.78	335.2	4.37	480	55.17	382.3	6.93
468	71.19	227.9	3.20	377	56.06	251.3	4.48	406	18.92	135.1	7.14
369	52.48	176.6	3.36	546	83.61	379.4	4.54	336	20.43	146.0	7.15
568	253.2	875.9	3.46	62	54.22	257.3	4.75	10	125.2	901.4	7.20
141	117.7	410.8	3.49	172	100.5	483.0	4.81	184	15.92	114.9	7.22
204	78.52	276.3	3.52	325	249.3	1319	5.29	444	34.12	299.7	8.78
21	59.53	212.8	3.57	367	91.47	499.4	5.46	46	33.16	324.6	9.79
100	151.2	566.9	3.75	466	54.05	299.7	5.55	254	29.53	291.6	9.87
578	531.8	2 006	3.77	570	51.09	288.8	5.65	494	67.31	685.1	10.2
198	192.2	726.6	3.78	111	148.5	853.9	5.75	561	101.3	1 333	13.2
481	77.46	310.3	4.01	537	65.94	382.6	5.80	577	62.20	886.9	14.3
29	79.24	326.0	4.11	505	204.3	1251	6.12	541	25.93	383.1	14.8

注 Notes：按倍数递增排列 表 5 同。The spots were arranged by their relative fold. The same for Table 5.

表 5 雄蚕生殖腺 2DE 图谱中蛋白含量大于雌蚕 3 倍的点

Table 5 The spots whose abundance in male is over 3-fold to that in female

匹配组号 Matched group ID	雌含量 Abundance in female	雄含量 Abundance in male	倍数 Fold	匹配组号 Matched group ID	雌含量 Abundance in female	雄含量 Abundance in male	倍数 Fold	匹配组号 Matched group ID	雌含量 Abundance in female	雄含量 Abundance in male	倍数 Fold
458	98.64	303.3	3.07	90	75.17	275.8	3.67	452	104.3	543.3	5.21
98	500.3	1549	3.10	422	227.8	851.4	3.74	392	99.60	539.9	5.42
132	152.4	485.8	3.19	287	147.5	566.7	3.84	136	168.9	921.7	5.46
210	117.6	382.5	3.25	341	32.72	126.5	3.86	311	804.3	4490	5.58
402	39.94	131.6	3.30	428	68.47	265.9	3.88	82	88.69	496.0	5.59
113	197.6	655.5	3.32	412	169.2	705.2	4.17	346	99.93	563.3	5.64
76	141.2	475.1	3.36	399	60.62	252.6	4.17	426	33.30	211.8	6.36
438	480.0	1623	3.38	170	78.66	331.0	4.21	342	119.7	982.1	8.20
457	126.9	431.6	3.40	550	89.66	394.3	4.4	69	534.0	4 750	8.89
301	135.2	474.2	3.51	266	99.42	461.7	4.64	92	461.1	4 584	9.94
142	640.4	2 266	3.54	133	77.00	360.8	4.69	323	133.0	1 498	11.3
152	90.28	321.5	3.56	497	60.93	288.2	4.73	50	99.91	1 363	13.6
121	87.71	319.5	3.64	443	197.4	956.8	4.85				
149	48.93	178.6	3.65	453	41.13	204.0	4.96				

3 讨论

家蚕作为一种生物研究的模式昆虫，在遗传学和发育学的研究中，有过许多的贡献，尤其是近年完成了家蚕基因组的测序工作（Xia *et al*.，2004；Mita *et al*.，2004），科学工作者转向于功能基因的研究。然而，对某些与性别、发育分化有关的功能基因，要直接从 DNA 水平上去研究其功能作用，难度很大。而蛋白质则是功能基因表达的直接体现者，因此，采用蛋白质组学的方法可以深入对这一问题进行研究。根据我们的试验，家蚕雌雄生殖腺除了在形态上有明显的差异，生殖腺的总蛋白也存在许多差异。双向电泳分析的结果表明，雌蚕有 55 个特异蛋白斑点，雄蚕有 73 个特异蛋白斑点。这种差异，我们认为来自两个方面：一是从试验材料上考虑，我们选取的是蛹期第 2 天的雌性卵巢和雄性睾丸蛋白，此时正值虫体从幼虫期过渡至蛹期的分化变态阶段，雌雄生殖腺处于旺盛的分化过程中，此时生殖腺的蛋白差异，应是卵巢和睾丸组织细胞的蛋白；二是从卵子或精子的发育与发生方面来考虑，蚕体化蛹后，雌雄生殖腺迅速发育，腺体中的蛋白质必然有形成卵子或精子的早期蛋白。如果我们能够从蛋白图谱中找出与决定性别相关联的，或与形成卵子或精子有关的蛋白斑点，进而回收分析，这对探索性别基因的表达调控是很有帮助的，也是我们后续的研究内容，

目前正对部分特异斑点蛋白进行分析。

本研究结果表明：57 限家蚕品种，雌雄间有 85.0%的蛋白斑点是相互匹配，表明其性质是比较一致的。但从量值上比较分析，有些蛋白斑点的含量也有较大的差别，反映了雌雄蚕间的蛋白质在表达丰度上存在差异，生殖腺细胞内的蛋白合成，受到各自基因调控的影响。这一现象是否暗示了同一类别的蛋白，在不同性别间可能表达着不同的活性与功能。至于两者之间存在着怎样的相互作用机制，以及这些蛋白在家蚕性别控制中起着怎样的作用，还需要今后更多的研究来揭示。

雄蚕特异性蛋白斑点数是雌蚕的 1.33 倍，但在等电点 4 ~ 7 之间的特异性蛋白斑点要少于雌蚕。蛋白分子量在 10 kD ~ 40 kD 之间的特异性蛋白斑点百分率，雌雄接近，这与靳远祥等(2005)报道的家蚕雌性附腺蛋白的等电点与分子量分布范围相似。

本实验用双向电泳的方法研究家蚕雌雄生殖腺的蛋白质差异，检测到多个特异性蛋白斑点，比较了雌雄共有蛋白斑点量值上的差异，并对它们的分布进行了统计分析。今后我们拟在现有的基础上，对这些特异性蛋白进行深入的分析鉴定，从更深层次了解家蚕性别基因的表达调控功能机理。

参 考 文 献 (References)

Hwang IH, Park BY, Kim JH, Cho SH, Lee JM, 2005. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. *Meat Science*, 69(1): 79 – 91.

Jin YX, Xu MK, Chen YY, Jiang YH, Du X, 2005. Extraction and two-dimensional electrophoresis analysis of proteins from the colleterial gland of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Seric. Sin.*, 31(1): 97 – 99. [靳远祥，徐孟奎，陈玉银，姜永煌，杜鑫，2005. 家蚕雌性附腺及其分泌物的蛋白质双向电泳分析. 蚕业科学，31(1): 97 – 99]

Lametsch R, Karlsson A, Rosenvold K, Andersen HJ, Roepstorff P, Bendixen E, 2003. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J. Agr. Food Chem.*, 51(24): 6 992 – 6 997.

Mita K, Kasahara M, Sasaki S, Nagayasu Y, Yamada T, Kanamori H, Namiki N, Kitagawa M, Yamashita H, Yasukochi Y, Kadono-Okuda K, Yamamoto K, Ajimura M, Ravikumar G, Shimomura M, Nagamura Y, Shin-I T, Abe H, Shimada T, Morishita S, Sasaki T, 2004. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.*, 11(1): 27 – 35.

Xie JY, Li XL, Chen P, Cao ML, Chen LB, Liang SP, 2003. Preliminary proteomic analysis of the proteins of thermo-sensitive genetic sterile rice anther. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.*, 19(2): 215 – 221. [谢锦云，李小兰，陈平，曹梦林，陈良碧，梁宋平，2003. 温敏核不育水稻花药蛋白质组初步分析. 中国生物化学与分子生物学报，19(2): 215 – 221]

Xia QY, Zhou ZY, Lu C, *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5 703): 1 937 – 1 940.

Zhan XQ, Guan YJ, Li C, Chen ZC, Xie JY, Chen P, Liang SP, 2002. Differential proteomic analysis of human lung adenocarcinoma cell line A-549 and of normal cell line HBE. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 34(1): 50 – 56. [詹显全，关勇军，李萃，陈主初，谢锦云，陈平，梁宋平，2002. 人肺腺癌细 A-549 和正常细胞 HBE 的蛋白质组差异分析. 生物化学与生物物理学报，34(1): 50 – 56]

Zhong BX, Yan HY, Shen FY, Li JK, Zhou L, 2003. Preparation of silkworm protein using two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Seric. Sin.*, 29(4): 427 – 432. [钟伯雄，颜海燕，沈飞英，李建科，周丽，2003. 家蚕蛋白质双向电泳的样品制备方法. 蚕业科学，29(4): 427 – 432]

(责任编辑：黄玲巧)